



Please Click here to view the drawing

Korean FullDoc

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030022428 A  
(43)Date of publication of application: 17.03.2003

(21)Application number: 1020010048442

(71)Applicant: KIM, DO MAN

(22)Date of filing: 11.08.2001

(72)Inventor: HUH, SU JIN  
KIM, DO MAN  
KIM, DO WON  
RYU, SU JIN

(51)Int. Cl C12N 1 /16

(54) ENZYME CAPABLE OF DECOMPOSING DEXTRAN, MICROORGANISM PRODUCING ENZYME, PREPARATION THEREOF AND COMPOSITION CONTAINING ENZYME

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is an enzyme produced by a microorganism which decomposes dextran and starch, present in the raw sugar of sugar cane and sugar beet, to simplify the sugar making process and enhance the quality of sugar by reducing the content of dextran in the final sugar product. CONSTITUTION: The preparation method comprises: a step of culturing *Lypomyces starkeyi*(ATCC 74054); a step of treating the cultured *Lypomyces starkeyi* ATCC 74054 with ethylmethane sulfonate; a step of spraying the above treated microorganism and culturing on a plate containing starch, 2-dioxy-D-glucose, blue dextran and agar; and a step of selecting dextranase and amylase with excellent activity by the degree of transparency in dextran circle and iodine experiment to obtain *Lypomyces starkeyi* KDM1 (KCTC 10026BP). The DXAMase recovered from the above process has molecular weight of 100kDa and possesses the activity of dextranase and amylase simultaneously. The decomposition method of dextran consists of adding 0.1-1 unit/ml of above DXAMase and treating for 10-15 minutes at 30-60deg.C and at pH5.5-6.5 initial juice, concentrated syrup or massecuite of sugar cane or sugar beet wherein 3-5% of each starch and dextran and 40-60% of sugar are contained.

copyright KIPO 2003

## Legal Status

Date of request for an examination (00000000)

Notification date of refusal decision (00000000)

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. C12N 1/16	(11) 공개번호 (43) 공개일자	특2003-0022428 2003년03월17일
(21) 출원번호	10-2001-0048442	
(22) 출원일자	2001년08월11일	
(71) 출원인	김도만 대한민국 500-820 광주 북구 문흥2동 787번지 6호 우성아파트 103동 902호	
(72) 발명자	김도만 대한민국 500-820 광주 북구 문흥2동 787번지 6호 우성아파트 103동 902호 김도원 대한민국 704-917 대구 달서구 성당2동 565-3 허수진 대한민국 503-330 광주광역시남구진월동대주아파트202동1409호 류수진 대한민국 500-042 광주광역시북구중흥2동329-7번지	
(74) 대리인	청운특허법인	
(77) 심사청구	없음	
(54) 출원명	덱스트란 분해능을 가지는 효소, 이를 생산하는 미생물, 이들의 제조 방법 및 그 효소를 함유하는 조성물	

#### 요약

본 발명은 덱스트란 분해능을 가지는 효소 및 이를 생산하는 미생물, 이들의 제조 방법 및 그 용도에 관한 것으로서, 좀 더 자세하게는 덱스트란 및 전분 분해능을 가지는 효소, 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054의 돌연변이 균주 리포마이세스 스타케이 KDM 1, 이들의 제조 방법 및 상기 효소를 설탕 제조시 사용하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 미생물로부터 제조된 효소는 사탕수수 또는 사탕무의 미정제 원당 생산과정에 존재하는 덱스트란과 전분을 분해함으로써 공정을 원활하게 하고, 원당내 덱스트란 함유량을 낮춤으로써 부가적인 비용 손실을 막을 뿐 아니라 최종 결과물인 설탕의 품질을 향상시키므로 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

#### 대표도

도3

#### 색인어

덱스트란, 전분, 설탕, 덱스트라나아제, 아밀라아제, 사탕수수

#### 명세서

##### 도면의 간단한 설명

도 1은 순수한 설탕만의 결정 모양을 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 2는 덱스트란 0.5%이 함유된 원당에서 형성된 설탕 결정의 모양을 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 3은 덱스트란 0.5%이 함유된 원당에 덱사메이즈(DXAMase)를 처리한 후 형성된 설탕 결정의 모양을 현미경으로 관찰한 사진이다.

##### 발명의 상세한 설명

##### 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 덱스트란 및 전분 분해능을 가지는 효소, 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054의 돌연변이 균주 리포마이세스 스타케이 KDM 1, 이들의 제조 방법 및 상기 효소를 함유하는 조성물에 관한 것이다.

덱스트란(dextran)은 상한 사탕수수 및 사탕무에서 일반적으로 발견되는 포도당의 다당체이다. 사탕수수 착즙에 덱스트란이 존재할 경우 시럽이 탁해지며, 시럽의 점도가 크게 증가하여 시럽의 여과 등을 어렵게 함으로써 전체적인 공정 속도를 늦추고, 설탕 결정 내로 끼어들어가 결정의 모양을 길게 유도하거나(도 1 및 도 2 참조), 결정의 성장 속도를 늦추어 상품의 질을 떨어뜨리고 손실되는 설탕의 양을 증가시키는 역할을 한다. 여러 가지 구조의 덱스트란 중 설탕 공정에서 가장 문제가 되고 있는 것은 수용성 덱스트란으로 이는 공정의 흐름에서 정도를 증가시킬 뿐 아니라 마지막 산물의 형태를 심하게 변형시킨다. 또한, 덱스트란은 빛을 오른쪽으로 편광시킬 수 있는 능력이 있기 때문에 사탕수수 착즙의 편광값(Pol reading)에 영향을 주어 착즙 순수도의 오판을 유도할 수 있다. 미국 등지에서 덱스트란에 의한 설탕의 손실량은 약 1~2%가량 되며, 편광값을 4.5%가량 증가시킨다고 알려져 있다. 또한, 브릭스(Brix)당 1000 ppm의 덱스트란이 존재하는 경우 당밀(molasses)의 순도(purity point)는 1.2~1.4 정도로 떨어지며 착즙의 경우는 브릭스 당 250 ppm 가량이 떨어진다. 최근의 연구 결과에 따르면 최종 당밀의 순도가 1 포인트 떨어지는 것은 가공 줄기 1 톤당 설탕 1 파운드(pound)가 손실되는 것에 해당하며 매일 6,000 톤의 줄기를 분쇄하고, 브릭스 당 250 ppm의 덱스트란을 포함하는 착즙을 처리하는 회사의 경우 매일 약 3,750 lb의 손실을 보게 된다. 루이지애나 주에 위치하는 공장의 자료에 의하면 250 ppm이상의 덱스트란을 함유한 사탕수수 착즙은 약 40% 가량이었으며, 750 ppm이상의 덱스트란을 함유한 사탕수수 착즙도 15% 이상인 것으로 알려졌다. 상기와 같은 이유로 원당의 주요 소비자인 설탕 정제 회사는 원당에 덱스트란이 들어있는 경우 벌금을 물리고 있으며, 따라서 미국의 설탕 사업자들은 다양한 시도를 통하여 덱스트란을 제거하기 위한 노력을 하고 있는 실정이다. 참고적으로 원당내 덱스트란 함유량에 따른 벌금 기준은 표 1과 같다.

[표 1]

설탕내 덱스트란(ppm)	패널티(%)	400.00/톤당 패널티(US \$)
250-350	0.007	2.8
350-450	0.009	3.6
450-550	0.011	4.4
550 이상	0.013	5.2

설탕생산 공정에서 덱스트란은 설탕을 탄소원으로 하여 자라는 류코노스톡 속의 균주 특히, 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)로부터 합성된다. 류코노스톡은 체외분비성 효소인 덱스트란수크라아제(dextranucrase; EC 2.4.1.5)를 이용하여 설탕을 대사하는데 상기 덱스트란수크라아제는 설탕의 포도당(glucose)을 연결하여 다당체인 덱스트란을 합성한다. 상기 류코노스톡 메센테로이데스 등의 덱스트란을 합성하는 미생물은 특히 젖은 진흙이 묻은 사탕수수에 많이 오염되고, 사탕수수 수확도중 기계나 냉동고, 질병에 의한 표면 조직의 노출에 의해서도 오염되고, 또한 사탕수수가 얼었다 녹는 과정에서 일어난다. 이밖에도 수확과 분쇄 공정 사이의 시간 지체, 기온의 급격한 하강, 기상 악화, 사탕수수 농장, 착즙장 및 공장의 위생상태, 계속되는 선적의 지연 등도 미생물의 오염을 부추기는 요인이다.

일반적인 설탕의 제조 공정에 대하여 알아보면 먼저 사탕수수를 자르고 자른 그대로 쌓아 놓은 다음 줄기 부분의 잎들을 태우고, 이렇게 준비된 사탕수수의 줄기를 원당생산 공장으로 보내게 되는데 이 수확기에 류코노스톡 균의 초기 오염이 일어난다. 상기의 방법으로 준비된 사탕수수가 원당 생산 공장에 도착하면 대부분은 도착하는 즉시 가공에 들어가는데 만일 사탕수수가 48시간 혹은 그 이상 가공되지 않고 쌓여있게 되면 이 기간 동안 덱스트란이 형성되며, 사탕수수에 이미 상처가 나 있는 상태라면 덱스트란 형성에 요구되는 시간은 더 짧아진다. 공장에서의 일반적인 공정으로는 사탕수수를 세척한 후 연속되는 분쇄기(mill)로 으깨어 줄기액을 생산한다. 상기 액은 보통 pH가 5~6이고 온도는 섭씨 30~35℃이며 브릭스(설탕을 기준 물질로 한 당의 농도)는 15인데 이 중에서 80~90%가 설탕이다. 다음으로 얻어진 줄기액을 끓이고 생석회(lime)를 넣어 pH를 7로 조절하여 맑은 용액을 만드는데 이때 생성되는 증기는 시럽을 만들기 위해 증발시킨다. 다음으로 50~80℃(120F~170F)에서 농축하여 시럽을 제조하고 이후에 결정 형성 작업에 들어가게 되는데 제조된 시럽의 pH는 일반적으로 pH 6.0~7이고 온도는 65℃이며 브릭스는 35도이다. 다음으로 농축된 시럽 내의 설탕을 결정화시키고 원당과 당밀을 분리하는데, 당밀로부터 설탕을 분리하는 것은 원심분리 방법을 사용한다. 이 때 덱스트란이 오염되어 있으면 설탕의 결정이 길어져서 원심분리시 당밀 속에 잔존하게 되므로 손실량이 증가한다. 일반적으로 사탕수수에서 파내어진 설탕액을 열처리하기까지는 약 10분 가량이 소요된다.

최근에는 사탕수수 수확의 기계화에 따라 사탕수수를 나무토막 모양으로 자르는 방법(Billet cut)이 선호되는데, 이 방법은 사탕수수 내부 노출 정도를 증가시킴으로써 미생물 감염의 확률을 높인다. 실제로 나무토막 모양으로 잘린 사탕수수를 2시간 가량 저장하였을 경우 모서리 부분에 약 6인치 가량의 덱스트란이 생성된 것이 관찰되었으며, 12 시간 저장 후에는 350 ppm 덱스트란/브릭스(Brix), 24시간 후에는 750 ppm 덱스트란/브릭스, 또한 48시간 후에는 3200 ppm 덱스트란/브릭스로 고농도의 덱스트란이 생성되었다.

사실상 사탕수수를 수확하고 분쇄하는 시간까지가 덱스트란이 가장 많이 생성되는 단계이므로 덱스트란 형성의 억제를 위한 가장 바람직한 방법은 사탕무 및 사탕수수 수확 방법 및 운반 방법을 개발 및 개선하여 사탕수수의 수확에서부터 가공까지의 시간을 최대한 단축하는 방법일 것이다. 그러나 기상 악화 등의 피할수 없는 요인에 의해 덱스트란이 형성되는 경우 폐기시 발생하는 경제적 손실 등을 감안하여 이에 대한 대책도 마련되어야 한다.

덱스트라나아제(EC 3.2.1.11)는 덱스트란을 작은 탄수화물 분자로, 선택적으로 분해하는 효소이다. 전술한 덱스트란에 의해 야기되는 문제들은 덱스트라나아제로 처리할 수 있음이 몇몇 회사의 연구를 통하여 확인될 수 있는데, 그 중 가장 좋은 효과를 보여 준 덱스트라나아제는 케토뮴(*Chaetomium*)을 사용하여 제조한 밀스(Miles)회사의 덱스트라넥스(DEXTRANEX) 라는 제품이다. 상기 제품은 공정 중의 높은 온도에서도 안정하였고 낮은 덱스트란의 농도에도 잘 작용하며, 호주 및 모로코에서 광범위하게 사용되는 것으로 알려져 있다. 또 다른 제품인 노보(Novo) 효소는 페닐실리움(*Penicillium*)으로부터 제조되는 제품으로서 호주의 설탕 생산 회사에서는 상기 제품을 사탕수수 혼합 착즙에 처리하고 있으며, 모로코에서도 사용되고 있다. 상기 덱스트라나아제를 사용하는 곳에서는 사탕수수 착즙 및 당밀의 정도가 크게 감소되고 따라서, 설탕 결정 형성 속도가 빨라지고 긴 결정이 생기는 것을 감소시킬 수 있으며(도 1, 2 및 3 참조) 가열 시간이 짧아지고, 정도의 감소로 인해 공정이 보다 빠르게 진행되는 이점이 있음을 확인하였다. 또한, 설탕 제조 공정이 끝난 후에는 설탕 내에 덱스트라나아제의 활성이 존재하지 않음을 확인하였다.

하루 6000톤의 줄기를 분쇄하는데 250 ppm 이상의 덱스트란이 함유되어 있는 경우, 당밀에서 수크로오즈(sucrose)를 회수하는 공정을 통해 얻을 수 있는 수익은 약 800~2500달러/하루인데, 수크로오즈 회수량을 증가시키고, 공정을 원활하게 하는데 따른 비용 절감 효과를 감안한다면 덱스트라나아제 사용 효과는 매우 크다. 또한 원당(raw sugar) 제조 공장의 경우 덱스트란 함유에 따른 벌금(penalty)을 지불할 필요가 없어 부가적인 수익 증대 효과를 볼 수 있는 장점도 있다.

상기 덱스트라나아제는 일반적으로 고농도의 덱스트란이 존재하거나 생성되리라 예상되는 시기에 사용될 수 있는데, 최적의 효과를 볼 수 있는 처리 시점을 찾기 위해 다양한 시도가 수행되어 왔다. 설탕 제조 공정 중 덱스트라나아제가 사용 가능한 시점은 다음과 같다. 첫째로 처음 얻어진 사탕수수 착즙에 처리한다. 특히 품질이 매우 나쁠 경우 생석회를 첨가하기 전에 넣어주는데, 초기 연구 결과에 따르면 낮은 온도에서 덱스트라나아제가 덱스트란을 분해하는데는 약 15분의 시간이 소요되고, 대부분의 공장에서는 분쇄에서 가열까지 약 10~12분 가량의 시간이 소요되므로 충분한 효과를 나타낼 것으로 예상되었다. 또한, 낮은 온도와 낮은 브릭스에서 효소가 더 잘 작용하리라는 점도 고려되었다. 레이스랜드(Raceland) 설탕 공장에서는 상기 방법으로 덱스트라나아제를 처리하였고, 효소 처리 시간을 늘리기 위해 첫번째 분쇄기(mill)에 덱스트라나아제를 처리하여 총 10분간 효소를 반응시키고, 착즙된 직후의 착즙 및 정제된 착즙로부터 얻은 샘플을 얻어 테스트를 하였다. 결과적으로 50% 정도의 덱스트란이 감소하였음을 확인하였다(Midland Research Laboratories, Inc. "Dextranase in sugar production: Factory experience" 1999, <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexexper.pdf>).

두번째로 가열기에 처리한다. 상기 덱스트라나아제는 열안정성이 높으므로 가열기에 처리할 경우 효과가 증대되리라는 예상에 따라 가열기에 상기 덱스트라나아제를 처리하였다. 그러나, 가열에 따라 브릭스가 65로 증가된다면, 효소의 열 안정성은 85℃ 이상이 되어야 하고, 분해 속도는 브릭스가 증가함에 따라 감소하게 되므로 상기 사항들을 고려하여 효소 처리량을 결정하여야 한다. 일반적으로 최종 가열기(last effect evaporator)에 처리하고 1000톤의 줄기를 가공할 경우 요구되는 덱스트라나아제의 처리량은 2파운드 가량이고, 고체량으로 환산하면 24 ppm 가량이다. 설탕 공정 연구 기관(Sugar Processing Research Institute)의 연구에 따르면 상기 방법을 사용한 결과 시험 내의 덱스트란 함유량은 70~75% 가량 감소되었고, 줄기 내의 덱스트란의 양은 20~60%의 감소 효과를 나타내었다. 또한, 원당의 경우는 1500 MAU에서 400 MAU로 감소함을 확인하였다(Clark, M.A., Edye, L. and Kitchar, J. Sugarcane factory trials with dextranase enzyme, Sugar Journal, Nov. 1997, 20-22). 95% 가량의 짙은 절단 줄기를 사용하는 알마 공장(Alma Plantation Factory)에서도 동일한 방법으로 덱스트라나아제를 처리한 결과 패널티 수준(penalty level) 이하로 덱스트란이 감소하였음을 확인하였다(Midland Research Laboratories, Inc. "Dextranase in sugar production: Factory experience" 1999, <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexexper.pdf>).

상기 결과들을 종합하였을 때 덱스트라나아제의 효과를 최대화하기 위해서는 먼저, 적어도 2개의 시험 저장탱크가 필요하다. 저장 탱크가 2개 있을 경우 반응 시간을 2배로 증가시킬 수 있으므로 시간, 온도, 브릭스를 조절할 수 있기 때문에 덱스트라나아제의 활성을 최대화하는데 필수적이며, 특히 시험의 경우 브릭스가 높고 온도가 높기 때문에 지체 시간(retention time)을 조절 인자로 사용하는 것이 가장 바람직할 것이다.

덱스트라나아제를 결정화(crystallizer) 이전 단계에 있는 저농도 마세퀴트(low-grade massecuite; 착즙 사탕수수액과 설탕 결정의 혼합액)에 넣었을 경우 마세퀴트의 높은 브릭스에 대해 덱스트라나아제가 효과가 있는지 확인하기 위하여 설탕 수확의 마지막 단계의 줄기에 덱스트라나아제를 넣어 주었다. 결과적으로 특정 수치는 보고되지 않았지만 저속 원심분리기(low-grade centrifugal)에 들어가는 마세퀴트의 정도를 감소시킬 수 있었다(Midland Research Laboratories, Inc. "Dextranase in sugar production: Factory experience" 1999, <http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexexper.pdf>). 코라 텍사스(Cora Texas)에서의 실험에 따르면 덱스트라나아제와 더불어 아밀라아제(α-amylase)를 같이 사용할 경우 사탕무 및 사탕수수에서 나오는 전분과 덱스트란을 더 효율적으로 줄일 수 있었고, 총 다당류의 양도 크게 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 총 다당류의 양이 감소됨에 따라 마세퀴트의 정도 또한 감소되고, 추가적인 실험에 따르면 각 효소는 다른 효소의 활성에 부차적인 효과를 주지는 않음이 확인되었다. 1981년에 19일이 지난 사탕수수 시험을 사용하여 설탕 결정을 생성하려는 시도가 있었는데, 상기 시험은 다루기 곤란할 정도로 정도가 높았지만 끓는 시점에서 덱스트라나아제를 처리한 후에는 정상적으로 결정화가 이루어짐을 확인할 수 있었다.

상기와 같은 높은 효율에도 불구하고, 상기 상업적으로 시판 가능한 덱스트라나아제들은 곰팡이인 페니실린(Penicillium)과 케토뿔(Chaetomium)을 이용하여 제조되고, 상기 곰팡이들은 덱스트라나아제와 더불어 여러가지 항생물질과 독성 대사산물을 생산하고 있기 때문에 미국에서는 식품의약부(FDA)의 허가를 얻지 못하고 있는 실정이며, 또한 제조 비용이 높고 대량 공급이 어려워 사용하는데 많은 제약이 있었다. 따라서, 상기 덱스트라나아제의 제조를 위한 새로운 미생물 및 제조 방법의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

리포마이세스 스타케이(Lipomyces starkeyi)는 자낭 포자성 효모균으로서 식품 관련 분야에서 광범위하게 이용되고 있고, 항생 물질이나 독성 물질을 생산하지 않는 것으로 알려져 있다. 상기 효모균은 덱스트란의 α-1,6-D-글루코피라노실(α-1,6-D-glucopyranosyl) 결합을 자르는 엔도-덱스트라나아제(endo-dextranase; EC 3.2.1.11)와 α-아밀라아제(α-amylase; EC 3.2.1.1)를 생산하는 것으로 알려져 있는데, 덱스트라나아제는 특별한 크기의 의약품 덱스트란 생산 과정에서 유용하게 사용될 수 있는 효소로 알려져 있다. 그 밖에 덱스트라나아제를 생산하는 미생물로는 페니실리움(Penicillium), 패실로마이세스(Paecilomyces), 아스퍼질러스(Aspergillus), 푸사리움(Fusarium), 스피카리아(Spicaria), 베르티실리움(Verticillium), 헬민토스포리움(Helminthosporium), 케토뿔(Chaetomium) 등이 있고, 세균으로는 락토바실러스(Lactobacillus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 셀비브리오(Celvibrio), 사이토파가(Cytophaga), 브레비박테리움(Brevibacterium), 슈도모나스(Pseudomonas), 코리네박테리움(Corynebacterium), 아스로박터(Arthrobacter), 플라보박테리움(Flavobacterium) 등이 알려져 있다.

그러나 상기 균주들로부터 생산되는 덱스트라나아제는 덱스트란 분해능이 그다지 높지 않으며, 그 발현량도 미미하여 상업적으로 사용되기에는 어려운 점이 많은 실정이다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 발명자들이 광범위한 연구를 수행한 결과, 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054의 돌연변이 균주를 제조하고, 상기 균주로부터 발현되는 덱스트라나아제 및 아밀라아제의 특성을 동시에 갖는 효소를 설탕 제조시 덱스트란 제거용으로 사용한 결과 뛰어난 효과를 나타냄을 확인하였으며, 본 발명은 이에 기초하여 완성되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 덱스트란 분해능이 높은 효소를 생산하는 미생물 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 미생물로부터 생산된 덱스트란 분해능이 높은 효소 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 효소를 포함하는 조성물을 설탕 제조시 덱스트란 제거용으로 사용하는 방법을 제공하는 것이다.

상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 신규한 미생물은 리포마이세스 스타케이 KDM 1이고, 2001년 7월 26일자로 한국종균협회부설 미생물 보존센터에 수탁번호 KCTC 10026BP로 수탁되었다.

상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 상기 미생물의 제조 방법은 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054를 배양하는 단계; 상기 배양된 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054를 에틸메탄설포네이트(ethylmethane sulfonate)로 처리하는 단계; 상기 에틸메탄설포네이트로 처리된 미생물을 전분, 2-디옥시-D-글루코오스, 블루덱스트란, 아가를 포함하는 플레이트에 도말하고 배양하는 단계; 및 블루 덱스트란의 투명한 형성 정도와 요오드 실험을 통해 덱스트라나아제와 아밀라아제 활성이 모두 우수한 균주를 선발하는 단계를 포함한다.

상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 효소는 본 발명의 신규한 미생물로부터 생산된 덱스트라나아제 및 아밀라아제 활성을 동시에 가지는 분자량 100 kDa의 효소이다.

또한, 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명 효소는 상기 리포마이세스 스타케이 KDM 1(KCTC 10026BP)을 배양하여 그 배양물로부터 회수하여 얻어진다.

#### 발명의 구성 및 작용

이하, 본 발명을 좀 더 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

본 발명에서는 먼저 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054를 돌연변이화 시켜 덱스트란 분해능이 뛰어난 효소를 생산하는 리포마이세스 스타케이 KDM 1을 제조하였다. 상기 돌연변이주의 제조시 본 발명에서는 에틸메탄설포네이트(ethylmethane sulfonate)를 사용한 랜덤 돌연변이화 방법을 사용하였으나, 이 밖에도 공지된 다양한 방법이 사용 가능하다.

또한, 본 발명자가 제조한 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054와 이의 또 다른 돌연변이주인 리포마이세스 스타케이 KSM 22(1999년 1월 29일, KFCC-11077)도 덱스트란 분해능이 높은 효소를 생산하므로 상기 리포마이세스 스타케이 KDM 1과 마찬가지로 설탕 제조시 덱스트란 제거를 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 리포마이세스 스타케이 KDM 1을 제조하는 방법은 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054를 배양하는 단계; 상기 배양된 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054를 에틸메탄설포네이트로 처리하는 단계; 상기 에틸메탄설포네이트로 처리된 미생물을 전분, 2-디옥시-D-글루코오스, 블루덱스트란, 아가를 포함하는 플레이트에 도말하고 배양하는 단계; 및 블루 덱스트란의 투명한 형성 정도와 요오드 실험을 통해 덱스트라나아제와 아밀라아제 활성이 모두 우수한 균주를 선발하는 단계로 이루어진다. 균주 선별시 블루 덱스트란은 덱스트라나아제에 의해 분해되어 투명한 색으로 변하므로 투명 밴드 혹은 환이 크게 생성되는 균을 선택함으로써 덱스트라나아제 고생산 균주 선별을 가능하도록 한다.

덱사메이저라 명명한 본 발명에 따른 효소를 순수 정제하기 위하여 본 발명의 리포마이세스 스타케이 KDM 1을 배양한 다음 배양액을 회수 및 농축하고 상기 농축액을 컬럼에 로딩하고 용출시켜 덱스트라나아제 활성과 아밀라아제 활성을 모두 갖는 분획을 모은다. 모아진 분획은 부가적으로, 제2의 컬럼 또는 크로마토그래피로 처리되어 최종적으로 정제된 형태로 얻게 되는데 상기 과정에서 배양액은 50K 홀로우 섬유(hollow fiber), PEG 및 아이소프로판올을 사용하여 농축이 가능하고, 컬럼으로는 DEAE-세파로오즈 컬럼(DEAE-Sepharose column), 바이오-래드(BIO-RAD) A-0.5 컬럼, CM-세파로오즈 컬럼(CM-Sepharose column) 및 하이드록시아파타이트 컬럼(Hydroxyapatite column)이 사용 가능하다. 또한, 크로마토그래피로는 겔퍼미에이션 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피가 사용 가능하다.

본 발명의 리포마이세스 스타케이 KDM 1의 배양시 탄소원으로는 전분, 덱스트란, 포도당, 설탕 이들의 혼합물로부터 선택된 물질이 사용 가능하며, 전분이 바람직하다.

전술한 방법으로 얻은 본 발명의 효소를 SDS-PAGE상에 전기영동한 결과 분자량이 100 kDa이었으며, 페놀 황산법(Phenol sulfuric acid method)으로 확인한 결과 당함량이 18 중량%( $\mu$ g 설탕/ $\mu$ g 단백질)인 당단백질이 확인되었다.

본 발명의 덱사메이저는 덱스트란 분해능 및 전분 분해능이 뛰어나므로 주로 설탕 제조시 덱스트란과 전분의 제거 및 공정의 효율 증대, 설탕 결정의 질을 향상시키기 위해 사용될 수 있으며, 상기의 방법으로 정제된 형태 뿐 아니라 본 발명의 덱사메이저를 함유하고 있는 미생물 배양액 자체를 사용할 수도 있다.

본 발명에 따른 덱사메이저의 덱스트라나아제 활성은 pH 4.0~7.0에서, 아밀라아제 활성의 경우에는 pH 3.0~5.5에서 최적 활성의 80%이상을 유지하였고, 결과적으로 덱스트라나아제 및 아밀라아제 활성은 pH 5.0에서 동시에 최대로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 온도에 따라서 덱스트라나아제 활성은 50℃, 아밀라아제 활성은 60℃에서 최대 수치를 나타내었으며, 덱스트라나아제 활성의 경우 50℃, 아밀라아제 활성의 경우 80℃ 이하에서 초기 활성의 80%를 유지함을 확인할 수 있었다.

본 발명의 일 실시예에서는 고농도 설탕 용액에서 pH, 온도 변화에 따른 본 발명 덱사메이저의 활성 변화를 측정한 결과 덱스트라나아제의 활성은 60% 설탕, 덱스트란 0.5%, 전분 0.3%, 온도 60℃, pH 4.0 및 pH 8.0에서 가장 높았으며, 아밀라아제의 활성은 50% 설탕, 덱스트란 0.5%, 전분 0.3%, 온도 40℃인 경우 pH 4.0 또는 5.5에서, 온도 80℃에서는 pH 4.0, 5.5 또는 6.5에서 가장 높음을 확인하였다.

또한, 고농도의 설탕 용액에서 온도 변화에 따른 덱사메이저의 활성 감소율을 측정한 결과, 덱스트라나아제의 활성은 60% 설탕용액, 60℃의 조건에서 가장 적게 감소되었으며, 아밀라아제 활성의 경우 60% 설탕용액, 80℃의 조건에서 가장 적게 감소됨을 확인하였고, 본 발명에 따른 효소가 최대 활성을 나타내는 온도를 측정한 결과 덱스트라나아제 활성은 60% 설탕 농도 및 60℃에서 가장 높았으며, 아밀라아제 활성은 50% 설탕 농도 및 40℃에서 가장 높음을 확인하였다.

또한, 기질 농도에 따른 본 발명의 덱사메이저의 덱스트란 및 전분 분해능을 확인한 결과 덱스트라나아제 활성은 기질을 4.5%로 사용한 경우에 좀 더 높은 활성을 나타내었으며, 아밀라아제의 경우 기질을 4%로 사용한 경우에 좀 더 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

또한, 기질 농도 및 효소 처리량에 따른 본 발명 효소의 덱스트라나아제 활성을 기준으로 하여 0.1 유닛을 사용하는 경우 전분이 0.3%, 덱스트란 0.4%, 60℃의 경우에 덱스트란과 전분의 분해활성이 높음을 확인하였으며, 덱스트라나아제 활성을 기준으로하여 1.0 유닛을 사용하는 경우 전분이 0.1%, 덱스트란 0.3%, 60℃의 경우에 덱스트란과 전분의 분해활성이 가장 높음을 확인하였다.

결과적으로 본 발명의 덱사메이제는 모균인 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054에서 제조되는 효소 (덱스트란 분해능 - 1.5 U/ml, 전분 분해능 - 7.5 U/ml) 보다 덱스트란 분해능(3.0 U/ml)의 경우 50%, 전분 분해능(12 U/ml)의 경우 62.5% 높은 활성을 가지므로 설탕 제조시 덱스트란의 분해를 목적으로 사용될 경우 그 효율이 매우 뛰어나다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 좀 더 구체적으로 살펴보지만, 이에 본 발명의 범주가 한정되는 것은 아니다.

#### 실시예 1

##### 덱스트라나아제 및 아밀라아제 고생산 균주의 제조

리포마이세스 스타케이 ATCC 74054를 0.5% 덱스트란(Sigma Chemical Co., USA)과 0.1% 효모 추출물(Difco laboratories, USA)을 함유하는 최소염배지 1%에서 28℃로 4일간 배양한 후 멸균한 100mmol<sup>-1</sup> 인산염 완충액(pH 7.0)에 현탁하였다. 1 ml 세포 현탁액에 100 µl 에틸메탄 설포네이트(ethylmethane sulfonate)를 넣고 5분, 10분, 20분간 처리한 후 소디움 티오설파이트(10%, w.v)를 첨가하였다. 세포를 인산염 완충액으로 2회 씻은 후 2층 아가 플레이트에 깔았다. 2층 아가 플레이트의 상층은 1% 전분, 0.05% 2-디옥시-D-글루코오스, 1.5% 아가를 포함하는 최소 염배지로 구성되며, 하층은 블루덱스트란(0.4% w/v)와 1% 아가로 구성된다. 블루 덱스트란의 투명한 형성 정도와 요오드 실험을 통해 덱스트라나아제와 아밀라아제 활성이 우수한 균주를 선발하였으며 이를 리포마이세스 스타케이 KDM 1이라 명명하였다.

#### 실시예 2

##### 효소의 제조 및 정제

1%(w/v) 수용성 전분(Yakuri Pure Co., Japan) 및 1%(v/v) 미네랄 수용액을 포함하는 LW배지 8 l가 담긴 배양기(Hanil R&D Co., Korea)에 1 % (w/v) 수용성 전분이 포함된 LW 배지에서 48시간 동안 배양하여 준비한 리포마이세스 스타케이 KDM 1 1.5%(v/v)를 넣고 배양하였다. 사용된 배지의 성분은 하기 표 2에 나타내었으며, 배지의 pH는 3.0 M NaOH를 이용하여 4.5로 유지하였으며 산소 공급 속도는 3.0 vvm, 온도는 28 ℃, 교반 속도는 250 rpm으로 유지하였다.

[표 2]

##### 배지 조성

	조성	농도(g/l)
미네랄 용액	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20
	NaCl	1
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1
	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.3
	탈이온수	
LW (pH 4.5, 28℃)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
	효모 추출물	3
	탈이온수	

48 시간 배양 후 원심 분리하여 상등액을 회수한 다음 50K 홀로우 섬유(hollow fiber)를 이용하여 1 l로 농축하였고, PEG를 사용하여 500 ml까지 더욱 농축하였다. 상기 효소 농축액(1.5 ml-20 mg 단백질/ml)을 20 mM 인산완충용액(pH 6.4)으로 평형시킨 DEAE-세파로오즈 컬럼(DEAE-Sephrose column; 2.5 cm × 25 cm)에 로딩하고 1.0 M NaCl을 포함하는 20 mM 포타슘 인산염 완충액(pH 6.0)으로 용출시켰다. 덱스트라나아제 활성과 아밀라아제 활성을 모두 갖는 분획을 모으고, 아이소프로판올을 첨가하여 농축시켰다. 농축물 3 ml을 50 mM 사이트레이트 인산염 완충액 (pH 5.5)로 평형시킨 BIO-RAD A-0.5 컬럼에 로딩하여 겔 퍼미에이션 크로마토그래피하여 덱스트라나아제 활성이 있는 분획을 모았다.

실시예에서 또한, 단백질은 BSA(Sigma Co., A-7517, USA)를 표준물질로 사용한 Bradford 방법을 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254).

다음으로 모아진 단백질 분획에 SDS(0.5%)와 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol; 1%)을 첨가한 후, 100℃에서 4분간 처리하여 불활성화시킨 다음 Laemmli의 방법에 따라 트리스-글리신 버퍼(tris-glycine buffer; pH 8.8) 및 10% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel) 상에서 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)하였다. 전기영동이 끝난 겔은 염료(Coomassie Brilliant Blue R-250)로 염색하였고, 분리된 단백질의 크기는 표준 단백질(Bio-Rad 사; Myosin 200 kDa, β-galactosidase 116 kDa, Phosphorylase b 97.4 kDa, Serum albumin 66.2 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Carbonic anhydrase 31 kDa, Trypsin inhibitor 21.5 kDa, Lysozyme 14.4 kDa, Aprotinin 6.5 kDa)을 기준으로 하여 결정하였다.

그 결과 리포마이세스 스타케이 KDM 1으로부터 생산된 덱스트라나아제와 아밀라아제 활성을 모두 갖는 효소의 분자량은 약 100 kDa이었고, 덱사메이제라 명명하였다.

#### 실시예 3

##### 효소의 활성과 안정성에 대한 pH의 영향

pH 2.5~7.5 범위의 50 mM 사이트레이트-포스페이트(citrate-phosphate; pH 2.5~3.5), 50 mM 피리딘 아세테이트(pyridine acetate; pH 4.0~5.5), 및 50 mM 인산완충용액(phosphate buffer; pH 6.0~7.5)에 덱스트란 2중량%, 전분 2중량%, 및 상기 실시예 2에서 얻은 덱사메이제를 첨가하고 22℃에서 48시간 방치한 후 덱스트라나아제와 아밀라아제의 표준 분석법(Kim, D., 및 Day, D. F., 1995. Lett. Appl. Microbiol., 20, 268-270; Robyt, J.F. and Bemis, S. Analytical Biochemistry, 19, 56-60)을 사용하여 활성을 측정하였고, 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

[표 3]

pH	상대적 효소활성(%)		상대적 효소 안정성(%)	
	덱스트라나아제	아밀라아제	덱스트라나아제	아밀라아제
3.0	74.5	90.7	58.2	41.1
3.5	76.6	94.2	69.6	68.8
4.0	83.1	100.0	92.3	100.0
4.5	86.7	88.5	100.0	91.3
5.0	100.0	79.1	98.5	84.6
5.5	95.1	78.1	94.6	79.3
7.0	81.2	48.5	73.5	55.8
8.0	35.3	10.8	42.6	47.0

그 결과 상기 실시예 2에서 정제된 효소의 덱스트라나아제 활성은 pH 4.0~7.0에서, 아밀라아제 활성의 경우에는 pH 3.0~5.5에서 최적 활성의 80%이상을 유지하였다. 또한, 덱스트라나아제 및 아밀라아제 활성은 pH 5.0에서 동시에 최대를 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

참고로, 본 발명의 모든 실시예에서 덱스트라나아제 활성 1 유닛은 1분 동안 효소 1 ml 당, 1%의 덱스트란 기질로부터 해리되는 글루코스의  $\mu\text{m}$  이수로 정의하였으며, 아밀라아제의 경우, 2% 수용성 전분을 기질로 사용하여 같은 방법으로 유닛을 정의하였다. 또한, 환원당의 양은 DNS 방법을 이용하여 측정하였다(Gilbert, G.A. 및 Spragg, S.P., "Iometric determination of amylose" in "Methods in Carbohydrate Chemistry"(R.L. Whistler, ed), Vol. 4, p. 168, Academic press, NY, 1964; Robyt, J.F. 및 Bemis, S. Analytical Biochemistry, 19, 56-60, 1967; Sumner, J. B., J. Biol. Chem., 47, 5-9, 1921).

진공 동결 건조기(Modulspin 3150, Hanil R&D)로 본 발명의 덱사메이즈를 동결 건조하여 표준물질로 사용하였다.

#### 실시예 4

##### 효소의 활성과 안정성에 대한 온도의 영향

효소의 최적 활성 온도는 덱스트란 2중량%, 전분 2중량%, 및 상기 실시예 2에서 얻은 덱사메이즈가 첨가된 인산 완충용액을 각각의 온도에서 15분간 반응시켜 반응 속도를 측정하여 결정하였고, 온도 안정성은 다양한 온도에 효소를 30분간 방치한 후 남은 활성도를 측정하였고 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

[표 4]

온도(℃)	상대적 효소활성(%)		상대적 효소 안정성(%)	
	덱스트라나아제	아밀라아제	덱스트라나아제	아밀라아제
4	14.2	2.1	100.0	100.0
10	17.6	18.8	100.0	100.0
23	38.3	41.2	100.0	100.0
28	58.1	50.4	100.0	98.3
37	75.3	98.4	96.5	91.3
45	91.6	99.7	88.3	81.2
55	100.0	100.0	65.2	53.2
70	52.6	57.7	35.3	37.3

그 결과 덱사메이즈의 덱스트라나아제와 아밀라아제의 활성은 모두 55℃에서 최대 수치를 나타내었으며, 덱스트라나아제와 아밀라아제 활성의 안정성은 모두 45℃까지 초기 활성의 80% 이상을 유지함을 확인할 수 있었다.

#### 실시예 5

##### 고농도 설탕 용액에서 pH와 온도 변화에 따른 효소 활성 변화

거저, 50% 설탕 용액, 덱스트란 0.5%, 전분 0.3%, 덱사메이즈 1 U/ml 조건의 반응액을 만들기 위하여 설탕 625 $\mu\text{l}$ (80% 설탕용액), H<sub>2</sub>O 35 $\mu\text{l}$ , 덱스트란(5% 용액) 100 $\mu\text{l}$ , 전분(5% 용액) 60 $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 샘플 12개를 준비하고, 상기 실시예 3과 동일하게 각각 pH 4, 5.5, 6.5, 및 8의 조건에 맞는 0.2M 완충용액 150 $\mu\text{l}$ 를 각 종류 별로 각 샘플 3개씩에 첨가하여 pH를 조정하고 다음 각 샘플에 덱사메이즈(덱스트라나아제 활성 기준으로 33 U/ml 저장액) 30 $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 총 부피 1 ml의 반응액을 제조하고, 각각 40, 60, 80℃의 온도에서 10분 동안 반응시켰다. 대조군으로는 덱사메이즈 대신 동일한 부피의 버퍼를 처리한 샘플을 사용하였다.

반응 종료 후 상기 12개의 샘플들의 반응을 정지시키기 위하여 100℃에서 3분 동안 가열하였고, TLC를 이용하여 덱스트란을 정량하는 방법과 요오드(Iodine)를 이용하여 전분을 정량하는 방법으로 반응액내 잔존하는 덱스트란과 전분의 양을 확인한 다음 초기 첨가량 대비 분해율(%)을 구한 후 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[표 5]

50% 설탕, 덱스트란 0.5%, 전분 0.3%의 조건 및 다양한 pH와 온도에서의 당에 대한 효소의 분해를 확인

	pH 4.0		pH 5.5		pH 6.5		pH 8.0	
	덱스트란	전분	덱스트란	전분	덱스트란	전분	덱스트란	전분
40℃	39.0	9.8	18.5	10.2	13.8	10.6	16.3	12.4

60℃	50.8	13.5	39.2	13.6	29.1	13.8	19.6	13.3
80℃	41.3	11.9	30.7	12.9	15.5	13.9	30.5	14.8

\* 값은 초기 다당의 가수분해 정도(%)

두번째로, 50% 설탕 용액, 덱스트란 0.2%, 전분 0.1%, 덱사메이즈 1 U/ml 조건의 반응액을 만들기 위하여 설탕 625 $\mu$ l(80% 설탕용액), H<sub>2</sub>O 100  $\mu$ l, 덱스트란(5% 용액) 40  $\mu$ l, 전분(5% 용액) 20  $\mu$ l, 상기 실시예 3과 동일하게 각각 pH 4, 5.5, 6.5, 및 8의 조건에 맞는 종류의 0.2M 인산 완충용액 185  $\mu$ l를 혼합하여 샘플 12개를 준비한 다음 상기와 동일한 방법으로 효소의 분해 활성을 측정하였고, 그 결과는 하기 표 6에 나타내었다.

[표 6]

50% 설탕, 덱스트란 0.2%, 전분 0.1%의 조건 및 다양한 pH와 온도에서의 다당에 대한 효소의 분해율(%) 확인

	pH 4.0		pH 5.5		pH 6.5		pH 8.0	
	덱스트란	전분	덱스트란	전분	덱스트란	전분	덱스트란	전분
40℃	26.0	94.5	14.1	93.9	14.1	86.2	44.8	79.3
60℃	34.6	81.1	18.4	81.1	26.5	81.1	49.0	76.0
80℃	35.1	83.2	5.7	82.4	26.0	83.7	46.5	64.8

\* 값은 초기 다당의 가수분해 정도(%)

상기 표 5 및 6에 나타난 바와 같이, 50% 설탕, 덱스트란 0.5%, 전분 0.3%의 조건의 경우 덱스트라나아제의 활성은 pH 4.0 및 pH 5.5, 60℃와 80℃에서 가장 높았으며, 아밀라아제의 활성은 pH 6.5 및 pH 8.0, 60℃와 80℃에서 가장 높았으며, 50% 설탕, 덱스트란 0.2%, 전분 0.1%의 조건의 경우 덱스트라나아제의 활성은 pH 8.0, 60℃와 80℃에서 가장 높았으며, 아밀라아제의 활성은 pH 4.0 및 pH 5.5, 40℃에서 가장 높았다.

#### 실시예 6

고농도의 설탕 용액에서 온도 변화에 따른 덱사메이즈의 활성 감소율

먼저, 50% 설탕 용액 및 덱사메이즈 1 U/ml 조건의 반응액을 만들기 위하여 설탕 625 $\mu$ l(80% 설탕용액), H<sub>2</sub>O 135 $\mu$ l, 20 mM 인산완충용액(pH 5.5) 150 $\mu$ l를 혼합하여 샘플 3개를 준비하고, 상기 샘플을 40℃, 60℃ 및 80℃에서 15분 동안 반응시킨 다음 각 샘플에 덱스트란(5% 용액) 100 $\mu$ l(0.5%), 전분(5% 용액; pH 5.5) 60 $\mu$ l (0.3%), 덱사메이즈(덱스트라나아제 활성 기준으로 33 U/ml 저장액) 30 $\mu$ l를 첨가하여 총 부피 1 ml의 반응액을 제조한 다음 40℃에서 10분간 반응시켰다. 대조군으로는 덱사메이즈 대신 동일한 부피의 버퍼를 처리한 샘플을 사용하였다.

반응 종료 후 상기 샘플들의 반응을 정지시키기 위하여 100℃에서 3분 동안 가열하였고, TLC 방법으로 반응액내 잔존하는 덱스트란을 정량하고, Iodine 방법으로 전분의 양을 확인한 다음 초기 첨가량 대비 분해율(%)을 구한 후 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

다음으로, 60% 설탕 용액 및 덱사메이즈 1 U/ml 조건의 반응액을 만들기 위하여 설탕 750  $\mu$ l(80% 설탕용액), 20mM 인산완충용액(pH 5.5) 60  $\mu$ l를 혼합하여 샘플 3개를 준비한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 반응액내 잔존하는 덱스트란과 전분의 분해율(%)을 구한 후 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

[표 7]  
설탕 농도와 온도에 따른 덱스트란과 전분의 분해율(%) (효소 활성의 안정성)

설탕농도	온도(℃)	덱스트란	전분
50%	40	78.6 %	54.8 %
	60	71.0 %	84.4 %
	80	90.3 %	36.7 %
60%	40	75.5 %	58.3 %
	60	65.4 %	58.5 %
	80	69.1 %	26.0 %

상기 표 7에서 관찰한 바와 같이, 고농도의 설탕 용액에서 온도 변화에 따른 덱사메이즈의 활성 감소율을 측정한 결과, 덱스트라나아제의 활성은 60% 설탕용액, 60℃의 조건에서 가장 적게 감소되었으며, 아밀라아제 활성의 경우 60% 설탕용액, 80℃의 조건에서 가장 적게 감소됨을 확인하였다.

#### 실시예 7

고농도의 설탕 용액에서 온도에 따른 효소의 활성 변화

먼저, 50% 설탕 용액, 덱스트란 0.5%, 전분 0.3%, 덱사메이즈 1 U/ml 조건의 반응액을 만들기 위하여 설탕 625 $\mu$ l(80% 설탕용액), 덱스트란(5% 용액) 100 $\mu$ l, 전분(5% 용액) 60 $\mu$ l, 20 mM 인산완충용액(pH 5.5) 185 $\mu$ l를 혼합하여 샘플 3개를 준비하고, 각 샘플에 덱사메이즈(덱스트라나아제 활성 기준으로 33 U/ml 저장액) 30 $\mu$ l를 첨가하여 총 부피 1 ml의 반응액을 제조한 다음 각각 40, 60, 80℃의 온도에서 10분 동안 반응시켰다. 대조군으로는 덱사메이즈 대신 동일한 부피의 버퍼를 처리한 샘플을 사용하였다.

반응 종료 후 상기 샘플들의 반응을 정지시키기 위하여 100℃에서 3분 동안 가열하였고, TLC 방법으로 반응액내 잔존하는 덱스트란을 정량하고, Iodine 방법으로 전분의 양을 확인한 다음 초기 첨가량 대비 분해율(%)을 구한 후 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.



다음으로, 60% 설탕 용액, 덱스트란 0.5%, 전분 0.3%, 덱사메이즈 1 U/ml 조건의 반응액을 만들기 위하여 설탕 750 $\mu$ l(80% 설탕용액), 덱스트란(5% 용액) 100 $\mu$ l, 전분(5% 용액) 60 $\mu$ l, 20 mM 인산완충용액(pH 5.5) 60 $\mu$ l를 혼합하여 샘플 3개를 준비한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 실험한 후 반응액내 잔존하는 덱스트란과 전분의 분해율(%)을 구한 후 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

[표 8]

온도에 따른 효소의 덱스트란과 전분의 분해율(%)

설탕농도	온도(℃)	덱스트란 분해율(%)	전분 분해율(%)
50%	40	61.7	65.8
	60	79.3	67.5
	80	53.3	38.6
60%	40	65.6	58.3
	60	87.4	62.6
	80	61.4	32.0

상기 표 8에서 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 효소의 덱스트라나아제 활성은 60% 설탕 농도 및 60℃에서 가장 높았으며, 아밀라아제 활성은 50% 설탕 농도 및 60℃에서 가장 높음을 확인하였다.

#### 실시예 8

기질 농도에 따른 덱사메이즈의 분해능 확인

먼저, 덱스트라나아제와 아밀라아제의 반응 산물을 알아보기 위하여 덱스트란 및 전분을 기질로 사용하고 endo-덱스트라나아제와 endo-아밀라아제를 이용하여 실험을 하였고 그 결과, 덱스트라나아제는 덱스트란과의 반응을 통해 주로 글루코스 23.4%, 아이소 말토스(isomaltose) 32.5%, 분지 사당 27.5%, 및 소량의 분지 오당과 분지 육당을 생산하였고 아밀라아제는 글루코스 19.5%, 말토스 8.2%, 말토 트라이오스 14.4%, 및 말토 테트라오스 8.4%를 생산함을 확인하였다.

다음으로, 80% 설탕 용액 500  $\mu$ l(설탕 40%), 10% 덱스트란 용액 400  $\mu$ l(덱스트란 4%) 및 33U/ml 덱사메이즈 저장 용액 100  $\mu$ l(3.3 U/ml)을 혼합하여 샘플 1을, 80% 설탕 용액 500  $\mu$ l(설탕 40%), 10% 덱스트란 용액 450  $\mu$ l(덱스트란 4.5%) 및 33U/ml 덱사메이즈 저장 용액 50  $\mu$ l(1.65 U/ml)을 혼합하여 샘플 2를, 80% 설탕 용액 500  $\mu$ l(설탕 40%), 전분 용액 400  $\mu$ l(전분 4%) 및 33U/ml 덱사메이즈 저장 용액 100  $\mu$ l(3.3 U/ml)을 혼합하여 샘플 3을, 80% 설탕 용액 500  $\mu$ l(설탕 40%), 전분 용액 450  $\mu$ l(전분 4.5%) 및 33U/ml 덱사메이즈 저장 용액 50  $\mu$ l(1.65 U/ml)을 혼합하여 샘플 4를 각각 제조하였다. 대조군은 덱사메이즈 대신 동량의 버퍼를 첨가한 샘플을 사용하였다. 제조된 샘플을 40℃에서 10분간 반응시킨 후 100℃에서 10분간 가열하여 효소의 활성을 정지시켰다. 모든 샘플의 반응이 끝난 후 반응액내 잔존하는 덱스트란과 전분의 양을 확인한 다음 초기 첨가량 대비 잔여율(%)을 구한 후 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

[표 9]

		분해율(%)
덱스트란 4%	샘플 1	46.9
	대조군 1	0
덱스트란 4.5%	샘플 2	34.1
	대조군 2	0
전분 4%	샘플 3	19.6
	대조군 3	0
전분 4.5%	샘플 4	23.2
	대조군 4	0

상기 표 9에서 본 바와 같이, 덱스트라나아제 활성은 기질을 4.5%로 사용한 경우에 좀 더 높은 활성을 나타내었으며, 아밀라아제의 경우 기질을 4%로 사용한 경우에 좀 더 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

#### 실시예 9

고농도의 설탕 용액에 섞여있는 덱스트란과 전분의 농도와 온도에 대한 효소의 분해 능력

고농도의 설탕 용액에 덱스트란과 전분의 첨가 농도를 하기 표 10과 같이 달리하고 덱사메이즈를 덱스트라나아제 활성 기준으로 0.1 혹은 1 U/ml 처리하여 각 온도에서 10분간 반응시킨 후 100℃에서 3분간 가열하여 효소 활성을 정지시켰다.

2든 샘플의 반응이 끝난 후 반응액내 잔존하는 덱스트란과 전분의 양을 확인한 다음 초기 첨가량 대비 잔여율(%)을 구한 후 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 10]

	대조군	덱사메이즈(0.1 U/ml)	덱사메이즈(1 U/ml)
덱스트란 0.1% 전분 0.1%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 335 $\mu$ l 덱스트란 20/전분 20 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 332 $\mu$ l 덱스트란 20/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 305 $\mu$ l 덱스트란 20/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l

덱스트란 0.2% 전분 0.1%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 315 $\mu$ l 덱스트란 40/전분 20 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 312 $\mu$ l 덱스트란 40/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 285 $\mu$ l 덱스트란 40/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l
덱스트란 0.3% 전분 0.1%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 295 $\mu$ l 덱스트란 60/전분 20 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 292 $\mu$ l 덱스트란 60/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 265 $\mu$ l 덱스트란 60/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l
덱스트란 0.3% 전분 0.2%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 275 $\mu$ l 덱스트란 60/전분 40 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 272 $\mu$ l 덱스트란 60/전분 40 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 245 $\mu$ l 덱스트란 60/전분 40 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l
덱스트란 0.4% 전분 0.1%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 275 $\mu$ l 덱스트란 80/전분 20 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 272 $\mu$ l 덱스트란 80/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 245 $\mu$ l 덱스트란 80/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l
덱스트란 0.4% 전분 0.2%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 255 $\mu$ l 덱스트란 80/전분 40 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 252 $\mu$ l 덱스트란 80/전분 40 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 225 $\mu$ l 덱스트란 80/전분 40 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l
덱스트란 0.4% 전분 0.3%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 235 $\mu$ l 덱스트란 80/전분 60 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 232 $\mu$ l 덱스트란 80/전분 60 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 205 $\mu$ l 덱스트란 80/전분 60 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l
덱스트란 0.5% 전분 0.1%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 255 $\mu$ l 덱스트란 100/전분 20 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 252 $\mu$ l 덱스트란 100/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 225 $\mu$ l 덱스트란 100/전분 20 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l
덱스트란 0.5% 전분 0.2%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 235 $\mu$ l 덱스트란 100/전분 40 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 232 $\mu$ l 덱스트란 100/전분 40 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 205 $\mu$ l 덱스트란 100/전분 40 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l
덱스트란 0.5% 전분 0.3%	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 215 $\mu$ l 덱스트란 100/전분 60 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 212 $\mu$ l 덱스트란 100/전분 40 $\mu$ l 덱사메이즈 3 $\mu$ l	설탕 625 $\mu$ l 20mM 버퍼 185 $\mu$ l 덱스트란 100/전분 40 $\mu$ l 덱사메이즈 30 $\mu$ l

[표 11]

고농도의 설탕 용액 상에서 덱스트란 및 전분의 농도와 온도에 대한 효소의

분해율

전분(%)	덱스트란(%)	효소 유닛					
		0.1 U			1 U		
		40℃	60℃	80℃	40℃	60℃	80℃
0.1	0.1	12.5	21.7	20.1	12.8	14.9	14.8
	0.2	21.9	20.7	6.7	22.3	15.5	22.4
	0.3	24.1	24.2	21.0	27.3	34.8	20.2
	0.4	26.1	23.9	29.3	11.5	15.2	21.0
	0.5	3.0	20.4	7.8	6.0	7.0	7.9
0.2	0.3	21.2	6.7	20.1	9.3	10.0	5.7
	0.4	12.0	19.9	16.3	8.4	11.7	8.2
	0.5	15.6	25.3	6.6	15.4	16.9	10.9
0.3	0.4	13.3	32.9	1.5	7.7	8.6	12.4
	0.5	4.1	29.9	5.0	25.6	15.4	5.6

상기 표 11에서 본 바와 같이, 본 발명 효소는 다양한 농도의 기질에 대하여 다양한 분해 정도를 보여 주었으며 덱사메이즈의 덱스트라나아제 활성이 0.1 유닛을 사용하는 경우는 전분 0.3%, 덱스트란 0.4%, 60℃의 경우에 가장 다량의 분해 정도가 좋았으며 덱스트라네이즈 활성 기준으로 1.0 유닛의 덱사메이즈를 사용하는 경우는 전분 0.1%, 덱스트란 0.3%, 60℃를 사용하는 경우가 높음을 확인하였다.

## 발명의 효과

본 발명의 미생물로부터 제조된 덱사메이즈는 사탕수수 또는 사탕무의 미정제 원당 생산과정에 존재하는 덱스트란과 전분을 분해함으로써 공정을 원활하게 하고, 원당내 덱스트란 함유량을 낮춤으로써 부가적인 비용 손실을 막을 뿐 아니라 최종 결과물인 설탕의 품질을 향상시키므로 매우 효과적이다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

덱스트란 분해능을 가지는 효소를 생산하는 리포마이세스 스타케이 KDM 1(KCTC 10026BP).

### 청구항 2.

리포마이세스 스타케이 ATCC 74054를 배양하는 단계;

상기 배양된 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054를 에틸메탄설폰에이트(ethylmethane sulfonate)로 처리하는 단계;

상기 에틸메탄설폰에이트로 처리된 미생물을 전분, 2-디옥시-D-글루코오스, 블루덱스트란, 아가를 포함하는 플레이트에 도말하고 배양하는 단계; 및

블루 덱스트란의 투명한 형성 정도와 요오드 실험을 통해 덱스트라나아제와 아밀라아제 활성이 모두 우수한 균주를 선발하는 단계를 포함하는 리포마이세스 스타케이 KDM 1(KCTC 10026BP)의 제조 방법.

### 청구항 3.

리포마이세스 스타케이 KDM 1(KCTC 10026BP)으로부터 회수된 덱스트라나아제 및 아밀라아제 활성을 동시에 가지는 분자량 100 kDa의 덱사메이즈(DXAMase).

### 청구항 4.

리포마이세스 스타케이 KDM 1(KCTC 10026BP), 리포마이세스 스타케이 ATCC 74054, 또는 리포마이세스 스타케이 KSM 22(기탁번호 KFCC-11077)의 배양액으로부터 회수된 덱스트란 분해능을 가지는 효소를 포함하는 조성물을 설탕 제조시 덱스트란 제거용으로 사용하는 방법.

### 청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 효소는 덱사메이즈인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 덱사메이즈 0.1~1 유닛/ml를 덱스트란 및 전분이 각각 3~5% 포함되어 있고 설탕 농도가 40~60%인 30~60℃, pH 5.5~6.5의 사탕수수 또는 사탕무 초기 착즙액, 농축 시럽, 및/또는 마세퀴트(massecuite)에 10~15분간 처리하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

## 도면

도면 1



도면 2



도면 3

